

Determination of cyanide in environmental water with continuous flow analysis system. Zhang Zhijun, Wei Juntong, Wu Jianxun, Luo Lihong (Hainan Environment Monitoring Station, Hainan, 528200)

The cyanide in environmental water was analyzed with continuous flow analysis system. The rate of analysis is 40 samples per hour with the detection limit of 0.002mg/L and the recovery is 96.0 % ~ 101.0 %. The results show that the method is rapid and accurate and can meet the requirements of water quality analysis.

研究综述

分析技术在铁蛋白结构与功能研究中的应用

曹廷明 黄河清 孔 波

(厦门大学生命科学院分析测试中心, 厦门, 361005)

摘 要 介绍了电子光谱、电化学、电子显微镜和生物质谱等分析技术在铁蛋白亚基结构、电子隧道、电极活性和释放铁动力学研究中的应用。

关键词 铁蛋白 分析技术 结构与功能

铁是生物体必需的微量元素,起着极其重要的生物学作用^[1-2]。铁在酶蛋白系统中分为铁-硫蛋白两大类和铁-卟啉蛋白两大类。在体内,铁蛋白的主要生理功能是储存游离铁离子、磷酸盐,避免铁中毒,并给生物机体供铁,用以合成含铁的蛋白质和酶^[3-4]。人类的许多疾病,如缺铁性贫血、白血病、铁中毒、恶性肿瘤等都与铁代谢异常有着密切的关系,因而人体内铁蛋白含量高低常被用作诊断各种疾病的重要依据^[5-6]。近十几年来,随着微量和超微量分析技术的发展和延伸,在铁蛋白生理功能和铁代谢途径方面的研究获得一系列具有科学价值的理论和应用成果,尤其在蛋白壳的结构与功能方面更为显著。本文侧重描述各种分析技术对阐明铁蛋白的亚基结构和电子隧道等理化特性以及铁蛋白的结构与功能,所起的关键性作用,为拓展生物分析技术提供实验模型。

1 铁蛋白标记物对细胞生物学研究的意义

铁蛋白具有高铁含量和含磷化合物的特征。铁

蛋白外形结构呈球形,见图 1。铁蛋白由蛋白壳和铁核两部分组成,前者由 24 个高度对称的亚基组成,形成球形空腔结构;后者由数千个氢氧化铁分子和数百个磷酸盐分子组成。蛋白壳外直径约为 11 ~ 13nm,厚度约为 3 ~ 5nm。铁核位于蛋白壳中心,直径约为 7 ~ 8nm。

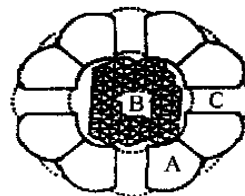


图 1 铁蛋白分子结构

A. 蛋白壳 B. 铁核 C. 物质交换隧道

1977 年, Sarciono 把带有放射性标记的¹⁴C - L - 亮氨酸掺入细胞培养基,和细胞一起培养,采用液闪分析技术,发现¹⁴C - L - 亮氨酸掺入量与铁蛋白生成量有对应的线性关系,经过换算可以得出铁蛋白的相对含量,并且提出了直接测定细胞生物合成

基金项目:国家自然科学基金(编号:40276033)和教育部骨干教师资助计划基金资助项目。

作者简介:曹廷明,男,博士研究生,主要从事蛋白质工程研究。

通讯联系人:黄河清,男,教授,分析测试中心主任,主要从事生物质谱分析和蛋白质组学研究。

铁蛋白含量的放射性分析技术。铁蛋白的铁核具有高电子密度,经 2% 磷钨酸染色和 15 万倍放大后,在电镜下呈黑色,因而被引入细胞化学和细胞免疫化学,建立了新的杂交瘤抗体免疫电镜法,可以用来检测和识别抗原和抗体的部位。这种免疫电镜分析技术已经广泛地应用于细胞抗原定位,对细胞生物学快速发展起到重要的推动作用。如从中国鲎卵巢中分离出未成熟的卵子,并与标记物铁蛋白进行培养,然后在电子透射显微镜下观察,发现铁蛋白能透过卵子细胞的基质,形成卵黄粒。用铁蛋白标记技术研究结肠癌细胞系 CCL229 细胞膜表面抗原的分布,结果表明,铁蛋白比其他标记物颗粒更大、反差更强,是细胞膜表面抗原理想的标记物。

2 电子光谱等分析技术研究铁蛋白结构

据文献报道,电子光谱、Mossbauer 谱和 X-射线衍射等分析技术对阐明铁蛋白隧道结构起着极其重要的作用^[7-9],揭示了铁蛋白壳结构的高度对称性。铁蛋白均由 24 个亚基组成,每两个亚基为一对,每对中的亚基相互平行,首尾相对,构成菱形十二面体的一个面,这个十二面体最终构成 432 点对称的蛋白壳。在十二面体上,沿二、三、四重轴,分别为铁蛋白亚基与亚基组成的 12 个二相隧道、8 个三相隧道和 6 个四相隧道,见图 2。

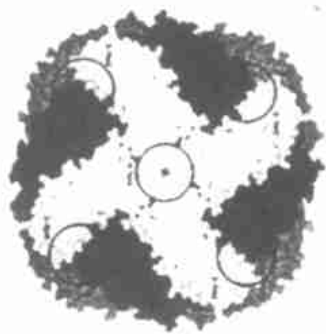


图 2 铁蛋白亚基、三相隧道和四相隧道

铁蛋白蛋白壳由 24 个亚基组成

图中央圆圈的中心点为四相隧道,图边缘圆圈为三相隧道

应用生物电化学技术研究铁蛋白电化学特性,发现铁蛋白隧道分为物质交换隧道和电子隧道。前者是铁蛋白储存和释放铁的通道,而后者是传递电子的通道。三相物质交换隧道(也称三相隧道)、四相隧道和电子隧道均被认为参与接受或传递电子反

应。但目前对四相和二相隧道生物学功能的看法还存在争议,尚缺乏合理的科学实验证据给予解释,因而仍是铁蛋白结构与功能研究的热点课题之一。

常规凝胶电泳技术研究表明,微生物(细菌、真菌、酵母菌)和低等无脊椎动物的机体内,铁蛋白均由一种类型亚基组成;而哺乳类动物的机体内,铁蛋白均由两种不同类型的亚基组成,即 H 和 L 亚基。据报道,人类铁蛋白有三种亚单位:L、H、G 亚单位。然而,上述实验结果一直处于争论中。其主要原因在于,H 和 L 亚基之间的分子量差另仅 1~2kD,有时因电泳蛋白质凝胶层析显示的分辨率过低,无法分开 H 和 L 亚基,因而误认为哺乳动物的铁蛋白由单亚基组成。1994 年,Zhao 等人^[10]采用毛细管电泳技术,在不同 pH 条件下,分离了马脾铁蛋白和兔肝铁蛋白 H 和 L 亚基。2001 年,Grady 等人^[11]用十二烷基硫酸钠(SDS)-毛细管凝胶电泳技术,定量分析了若干种马脾铁蛋白 H 和 L 亚基的比例,这一结果为阐明铁蛋白的结构和亚基组成,提供了可信度较高的科学依据。

3 电化学技术研究铁蛋白接受和传递电子的能力

在自然界中,绝大多数蛋白质在物理电极上呈电惰性。早在 1980 年,Imai 就设计了以汞为阴极的三电极体系电解池,采用脉冲极谱法研究马脾铁蛋白在汞电极上的还原性。结果显示,该蛋白在汞电极上无还原电流,因而认为马脾铁蛋白类似其他蛋白,在电极上呈电惰性。1985 年,Watt 发现经还原后的铜蛋白和蓝蛋白能直接还原马脾铁蛋白铁核中的铁;由于这两种蛋白的分子大于马脾铁蛋白三相物质交换隧道的宽度,无法借助该隧道通过扩散方式还原铁蛋白铁核中的铁,因而提出铁蛋白可能有横跨蛋白壳的电子隧道结构,还原的铜蛋白能通过电子隧道把还原电子输送给铁核。1998 年,黄河清等人^[12]采用恒电位电量法研究细菌铁蛋白电化学,发现细菌铁蛋白能在由铂金电极为阴极的三电极电解池中被还原,因而提出细菌铁蛋白是一种非电极惰性蛋白质,横跨蛋白壳的血红素参与组成电子隧道结构,具有能直接从铂金电极上获得还原电子还原铁核中铁的能力。此外,黄河清等人^[12]还进一步说明,汞是蛋白质的变性剂,马脾铁蛋白吸附在汞电极上,由于受汞的影响,而使蛋白质变性,失去

电子隧道结构,因而无法直接从汞电极上获得还原电子。2000 年,Zapien 等人^[13]研究发现,铁蛋白可直接吸附在黄金电极上,并从电极上获得还原电子,这一现象进一步说明铁蛋白类似细胞色素 C,也是一种非电极惰性蛋白质。近年来,在用生物电化学技术研究哺乳动物铁蛋白从物理电极上接受电子传递机理的过程中,同样也证实了哺乳动物铁蛋白能从铂金电极上获得电子并用于自身的铁还原^[14],这也说明铁蛋白具有电子隧道结构。这些研究结果为今后研制铁蛋白电极提供了科学依据。

4 MALDI-TOF 质谱技术研究铁蛋白结构

近年来,随着人类基因组图谱的顺利完成,基因组学发生翻天覆地的变化,其中结构基因组学、功能基因组学、蛋白质组学已经迅速发展成为本世纪生命科学最有挑战性和前瞻性的研究领域,它们将继续解决基因功能组学无法解决的一系列重大难题。开展蛋白质组学研究和建立多肽库所需要的基本手段是高效液相色谱分离技术、双向凝胶电泳分离技术和生物质谱分析技术。前两者用于分离细胞释放的全蛋白和多肽,后者用于分析蛋白质和多肽的结构信息。目前常用于分析生物大分子结构信息的质谱技术,主要有快原子轰击质谱、电喷雾电离质谱和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight, MALDI-TOF)等。电喷雾电离质谱的特色是,在没有外能输给待测样品的条件下,把待分析的生物大分子转化成带多电荷的分子离子,而几乎不产生新的碎片分子离子,有利于化合物结构推导。MALDI-TOF 质谱技术是在基质辅助下,采用不同激光强度解吸电离,使被分析物离子化,成为分子离子^[15-19]。

据大量的文献检索,有关质谱技术研究铁蛋白结构与功能的研究工作不多。2002 年, Park 等人^[20]用高分辨率双向凝胶电泳技术分离人类铁蛋白轻链亚基,用胰蛋白酶消化技术和 MALDI-TOF 质谱技术研究该轻链亚基的肽指纹图谱,用于轻链亚基的部分一级结构分析^[20]。

近期,作者用 MALDI-TOF 质谱技术研究鱼肝铁蛋白蛋白壳外表层电荷分布,发现蛋白壳存在着高密度的正电荷区域,并提出了电荷分布模型,为铁蛋白是非电极惰性蛋白质的论断提供了理论依据和实验证据。

5 电子光谱技术研究铁蛋白释放铁动力学

早期的研究认为,还原剂是通过铁蛋白蛋白壳上的物质隧道进入蛋白壳腔内,并直接还原铁核中的铁,从而使铁核中的铁得以释放,铁蛋白蛋白壳的三相物质交换隧道宽度直径仅为 0.3~0.4nm。而近期研究却发现,分子直径大于 0.4nm 的 FMNH₂、FADH₂、BV 和 MV 等大分子还原剂却能够直接还原铁蛋白铁核中的铁,并将铁释放于蛋白壳外,其释放铁的速率与这些大分子还原剂各自的氧化还原电位有关,而与其分子半径无关。这一现象说明,铁蛋白隧道宽度直径大于 0.4nm 才能使这些还原剂自由出入蛋白壳内外;或者这些还原剂无需通过物质隧道进入蛋白壳内,而是利用横跨蛋白壳的电子传递隧道进行电子传递和参与释放铁的反应。在近期的研究中,黄河清等发现,通过外加扫描电位的方法能够明显提高铁蛋白储存有机小分子(亚甲蓝、劳氏紫)的能力,这提示三相物质隧道可能不是刚性结构,而是可调控的柔性结构,铁蛋白的蛋白壳有一定柔性调节能力,能形成较宽的隧道,使分子直径大于 0.4nm 的有机小分子自由地出入蛋白壳,并被储存于蛋白质壳内。

早期的研究受铁蛋白质蛋白壳是刚性结构论点的影响,认为铁蛋白释放铁的限制性步骤受铁核表面复杂的磷铁结构的控制,提出铁的释放速率与还原剂和铁核形成的复合物有关;不同还原剂还原过程中铁释放速率的差异是由于它们与铁核形成的复合物性质不同,其释放铁的动力学全过程不符合零级、一级、二级中任何一个动力学方程^[21-23]。生物电化学技术研究表明,细菌铁蛋白释放全过程呈现双相特性,两相均符合一级动力学方程^[23]。此外,不同来源的铁蛋白(马脾铁蛋白和细菌铁蛋白),虽然铁核中的铁量和磷量不同,但释放铁的全过程却表现为相同的动力学特性,即以一级动力学方式释放铁核表层的铁,而以零级方式释放铁核内层的铁;改变铁核中的铁磷结构,不能使释放铁的动力学规律由混合级转变为简单的一级或二级,这说明铁核表层的铁磷结构不是影响释放铁动力学的主要因素,这种差异来源于各自蛋白壳调节能力的不同。早期的动力学研究都集中在铁核的作用和隧道的实际宽度,忽视了蛋白壳的作用。

而近斯的研究集中在探讨蛋白壳非刚性结构,强调在铁的释放过程中,蛋白壳调节能力的幅度高

低和速率快慢是释放铁的限速步骤。尽管铁蛋白以一级方式释放表层的铁,但由于这种调节能力很有限,随着铁核表层铁释放量的递增,蛋白壳对铁核内层铁的调节能力逐渐减弱,促使铁蛋白释放动力学规律由一级方式转变为零级方式。此外,介质中的 H^+ 和 OH^- 不仅能参与铁核的构成,而且还能与蛋白壳内外表层的氨基酸结合,从而影响蛋白壳的构象,影响蛋白壳的柔性调节能力。显然,这种调节能力大小直接影响蛋白壳上物质隧道的宽度,从而直接影响释放铁的速率,使铁蛋白释放铁的过程复杂化,无法遵循任何一级动力学过程。这一论点比较合理地解释了困惑几十年的铁蛋白释放铁全过程复杂化的起因,为拓展铁蛋白新生理功能起到重要的推动作用。

参考文献

- 1 Harrisons P M, Arosio P. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1996, 1275: 161 - 203
- 2 Huang H Q et al. *Journal of Protein Chemistry*, 1999, 18: 497 - 504
- 3 Huang H Q et al. *Bioelectrochem and Bioenerg*, 1999, 48: 87 - 93
- 4 Treffry A et al. *FEBS letter*, 1998, 432: 213 - 218
- 5 Bauminger E R, Nowik I. *Hyperfine Interactions*, 1998, 111: 159 - 170
- 6 Hou J et al. *Obstetrics and Gynecology*, 2000, 95: 447 - 452
- 7 Suryakarch S, Desphaute V. *Veterinary Research Commu-*
nication, 1999, 23: 165 - 168
- 8 Huang H Q et al. *Journal of Protein Chemistry*, 2000, 19: 441 - 447
- 9 Kilcoyne S H et al. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 2000, 160: 157 - 166.
- 10 Zhao Z et al. *Analytical Biochemistry*, 1994, 218: 47 - 54
- 11 Ceady J K et al. *Analytical Biochemistry*, 2002, 302: 263 - 268
- 12 Huang H Q et al. *Bioelectrochem Bioenerg*, 1998, 44: 301 - 307
- 13 Zapien et al. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2000, 493: 114 - 120
- 14 Huang H Q et al. *Biophysical Chemistry*, 2002, 97: 17 - 27
- 15 Davis M T et al. *Journal of Chromatography*, 2001, 752: 281 - 291
- 16 Emili A Q, Cagney G. *Nature Biotechnology*, 18: 393 - 397
- 17 Thorsson G W et al. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2001, 24: 815 - 824
- 18 Hummon A B, Huang H Q, Sweedler J V. *Journal of Neurochemistry*, 2002, 82: 1398 - 1405
- 19 Andersen J S, Mann M. *FEBS Letter*, 2000, 480: 25 - 31
- 20 Park K S et al. *Hepatology*, 2002, 35: 1459 - 1466
- 21 Huang H Q et al. *Biochemistry*, 1993, 32: 1681 - 1687
- 22 Kong B, Huang H Q et al. *Journal of Protein Chemistry*, 2003, 22: 61 - 70
- 23 Richards T D et al. *J Inorg Biochem*, 1996, 61: 1 - 13

收稿日期: 2002 - 09 - 18

Application of analytical techniques in the study of structure and functions of ferritin. Cao Tingming, Huang Heqing, Kong Bo (Center for Analysis and Testing, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, 361005)

Application of electron spectroscopy, electrochemistry, electron microscope and biological mass spectrometry in the study of substructure, electron tunnel, electrode activity and iron release kinetics of ferritin are described.

《分析化学辞典》

清华大学邓勃教授主编的《分析化学辞典》已于 2003 年 2 月由化学工业出版社出版。

该书是一部分析化学综合性工具书,收集分析化学及其相关学科的词条约 5300 余条,内容涉及分析化学的各个领域。对分析化学中重要的定义、概念、常用的术语、分析方法、分析技术等分别列

为词条,并对每一词条的含义都做了简明扼要的诠释。本书可供化学、化工、冶金、地质、环境、医药卫生、农业、商检与其他领域从事分析测试的人员,以及大专院校有关专业的师生参考。

全书 1220 千字,定价 86.00 元。